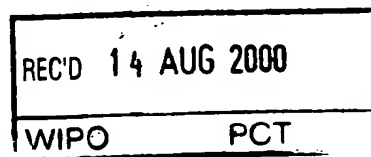


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

DE 00/1950



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

199 28 313.3

10/018113

Anmeldetag:

16. Juni 1999

Anmelder/Inhaber:

Dr. Ullrich Keller,
Berlin/DE

Bezeichnung:

Verfahren zur Veränderung von Peptidsynthetasen
in der Weise, dass sie ihre Substrataminosäuren
N-methylieren können

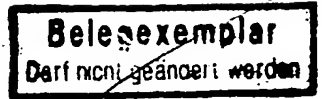
IPC:

C 12 N 9/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks



Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können. Dies wird durch eine gezielte Modifikation oder Austausch der funktionellen Untereinheiten (Aktivierungsdomänen) dieser Enzyme erreicht.

Peptidsynthetasen (PPS) sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse, wie beispielsweise die Penicilline, Vancomycin, Cephalosporin, Pristinamycin oder das Actinomycin D. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul einer PPS erkennt, aktiviert und bindet jeweils eine Aminosäure. Einige PPS-Module akzeptieren auch ungewöhnliche (nicht proteinogene) Aminosäuren als Substrate, wie beispielsweise die alpha-Aminoadipinsäure (in Penicillin) oder das Phenylglycin (in Pristinamycin). Die von der PPS katalysierte Synthese eines Peptides erfolgt durch die enzymkatalysierte Kondensation der an den Modulen gebundenen Aminosäuren. Diese Kondensation ist gerichtet, und zwar in der Weise, daß die am ersten Modul der PPS (bezogen auf den N-Terminus der PPS) gebundene Substrataminosäure den Anfang (N-Terminus) des synthetisierten Peptids bildet. Somit bestimmt die Anzahl und die Reihenfolge der Module innerhalb einer PPS die Länge und die Sequenz des synthetisierten Peptides (Kleinkauf H., von Döhren H. (1990) Eur. J. Biochem. 192:1-15). Dies ist von entscheidender Bedeutung, da bei einem Austausch bzw. dem Einfügen oder Deletieren von PPS-Modulen auf genetischem Wege die Struktur des danach gebildete Produkt vorhersagbar ist.

Allen bekannten PPS-Modulen ist gemeinsam, daß sie sich aus mindestens drei funktionellen Domänen zusammensetzen (Abbildung 1A). Diese drei Domänen sind (1) die Adenylierungs-Domäne, notwendig für die Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure, und (2) die ACP-Domäne, notwendig für die kovalente Bindung der adenylierten Aminosäure in Form eines Thioesters und (3) die Kondensationsdomäne, notwendig zur Kondensation aller an der PPS gebundenen Aminosäuren zum synthetisierten Peptid (Stachelhaus *et al.* (1995) FEMS Microbiol. Lett. 125:3-14). Die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne werden zusammen auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet (Abbildung 1A), da sie zusammen die Erkennung und kovalente Bindung der Substrataminosäure in Form eines reaktiven Thioesters ermöglichen. Eine besondere Gruppe bilden jene Aktivierungsdomänen, die ihre Substrataminosäuren nach der kovalenten Bindung auch N-methylieren können. Bei PPS mit solchen Aktivierungsdomänen enthält folglich das bei der nachfolgenden Kondensation entstehende Peptid auch N-methylierte Aminosäuren. Die Zahl der zur Zeit bekannten bzw. klonierten Gene kodierend für Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität (11 Domänen) ist jedoch deutlich geringer als die Zahl der Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität (über 80 Domänen). Zudem zeigen viele der Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität eine vergleichbare Substrataktivität, wie z.B. für die Aminosäure Valin in den Modulen der Actinomycin Synthetase II aus *Streptomyces chrysomallus* (Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol.

180 : 2468-2474), der Cyclosporin Synthetase aus *Tolypocladium niveum* (Weber *et al.* (1994) Cur. Genet. 26:120-125) und der Enniatin Synthetase aus *Fusarium scirpi* (Haese *et al.* (1993) Mol. Microbiol. 7:905-914).

5 Die hier beschriebene Erfindung ist deshalb von Bedeutung, da sie auch die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität beschreibt, wobei die ursprüngliche Aminosäure-Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein
10 entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das von der PPS synthetisierte Peptid an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen, neuen pharmakologischen Eigenschaften. Viele der bereits bekannten pharmakologisch aktiven Peptide und Peptid-Derivate, wie beispielsweise das Cyclosporin, enthalten N-methylierte Aminosäuren. Die durch die Erfindung erreichbare, selektive N-Methylierung einzelner Stickstoffatome in den Peptidbindungen von Polypeptiden, ist durch chemische Methoden kaum oder nicht möglich.

Die Erfindung basiert darauf, daß alle Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität
20 eine zusätzliche Domäne besitzen, welche zwischen der Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne lokalisiert ist (Abbildung 1 B). Diese zusätzliche Domäne wird im Weiteren als N-Methyltransferase-Domäne bezeichnet und vermittelt die N-Methylierung der gebundenen Substrataminosäure. Die Erfindung beinhaltet Verfahren zur Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität und deren Nutzung zur Neukonstruktion von PPS für die Synthese
25 von N-methylierten Aminosäuren und Peptiden. Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität einer PPS können prinzipiell durch zwei Wege in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität überführt werden:

(1) Ein ganzes Modul oder die ganze Aktivierungsdomäne einer PPS wird ausgetauscht. Dieses Verfahren ist in Beispiel 2 beschrieben.
30

(2) Eine N-Methyltransferase-Domäne wird als funktionelle Einheit in eine Aktivierungsdomäne inseriert. Die N-Methyltransferase-Domäne kann beispielsweise direkt zwischen die Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne inseriert werden (Abbildung 2 A). Zur Insertion können auch zwei dicht
35 benachbarte Fusionsstellen genutzt werden. Hierbei wird der zwischen den Fusionsstellen liegende Bereich in der umzuwandelnden Aktivierungsdomäne deletiert und durch entsprechende Bereiche ersetzt, die zusammen mit der N-Methyltransferase-Domäne inseriert werden (Abbildung 2 B). Dieses Verfahren ist in Beispiel 3 beschrieben. Bei der Verwendung von zwei Fusionsstellen kann die N-Methyltransferase-Domäne auch als Block mit einer
40 nachfolgenden ACP-Domäne (oder Teilen davon) hinter die Aktivierungsdomäne inseriert werden, wodurch es zu einem Austausch der ursprünglichen ACP-Domäne durch die inserierte

ACP-Domäne (bzw. Teilen davon) kommt (Abbildung 2C und 2D). Bei allen Insertionen bleibt die Substratspezifität der umgewandelten Aktivierungsdomäne aber erhalten, da die Adenylierungs-Domäne (Erkennung und Adenylierung der Substrataminosäure) nicht verändert wird.

5 Geeignete Insertionsstellen für die Insertion der N-Methyltransferase-Domäne in eine Aktivierungsdomäne werden durch den Übergang zwischen Adenylierungs-Domäne und ACP-Domäne festgelegt. Diese ergeben sich aus dem Sequenzvergleich zwischen Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Domäne und Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Domäne (Abbildung 3). Die N-Methyltransferase-Domänen liegen als
10 Einschub etwa 45 Aminosäuren hinter (C-terminal) der als „core motif 5“ bekannten Konsensussequenz QVKIRG(F/H/Y)RIE(L/I)GEIE (Turgay *et al.* (1992) Mol. Microbiol. 6:529-546) der Adenylierungs-Domäne und unmittelbar N-terminal zur Konsensussequenz (Q/E/D) (I/V) REX (V/L) xxxLPXYM(V/I) P.

5 Alle beschriebenen Methoden zur Umwandlungen einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität oder deren Verwendung zur Konstruktion neuer PPS beinhalten eine gezielte Veränderung und Kombination der entsprechenden DNA-Abschnitte von Peptidsynthetase Genen. Hierzu wird der DNA-Abschnitt, welcher für die N-Methyltransferase-Domäne einer beliebigen
20 Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität kodiert, in das DNA-Segment, welches für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, eingefügt. Dies muß in einer Weise geschehen, daß sich nach der Insertion ein gemeinsamer Leserahmen bildet und die kodierte N-Methyltransferase-Domäne integraler Bestandteil der kodierten Aktivierungsdomäne wird. Hierfür kann beispielsweise das DNA-Fragment aus einem Gen einer PPS, welches komplett oder
25 teilweise für die umzuwandelnde Aktivierungsdomäne kodiert, in Plasmiden kloniert werden. Zur Klonierung und Modifikation von DNA können alle gängigen Methoden der Molekularbiologie verwendet werden, wie beispielsweise die Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Klonierungen und DNA-Manipulationen können in allen für diese Zwecke geeigneten Plasmiden und Organismen, wie beispielsweise pUC-Plasmiden und *E.coli*, erfolgen. Bei der Klonierung und
30 Modifikation der DNA können bereits vorhandene oder beispielsweise durch PCR erzeugte Restriktionsschnittstellen genutzt werden. Solche Verfahren sind in Beispiel 1 beschrieben und beinhalten die Einführung einer Restriktionsschnittstelle in die DNA des Gens der Actinomycin Synthetase II, welche dann zum nachfolgenden Modulaustausch genutzt wird.

35 Durch die Insertion eines für die N-Methyltransferase-Domäne kodierenden DNA-Segments in das Gensegment einer PPS können neue PPS konstruiert werden. Die Expression eines neuen PPS-Gens kann in Plasmiden erfolgen und zur Synthese neuer Produkte führen. Dies ist in Beispiel 4 beschrieben und beinhaltet die Expression eines rekombinanten PPS-Gens nach der Transformation eines entsprechenden Plasmids in *Streptomyces lividans* und den Nachweis der
40 katalytischen Aktivität der von dem PPS-Gen kodierten PPS. Auch können DNA-Segmente dazu genutzt werden, PPS-Gene in das Genom von Organismen einzuführen oder bereits im Genom

vorhandene PPS-Gene zu verändern, wie beispielsweise gezeigt beim Gen der Surfactin Synthetase in *Bacillus subtilis* (Stachelhaus *et al.* (1995) Science 269(5220):69-72). Entsprechend können daher auch Module mit N-Methyltransferase-Aktivität in genomische PPS-Gene eingebracht werden und zur Bildung neuer, N-methylierter Peptide führen.

5

Beispiele

Im Folgenden wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben.

Die bei der Durchführung der Beispiele verwendeten Plasmide (pSP72, pBlueScript, pIJ702, pSPIJ004 und pACM5) sind in Abbildung 4 schematisch gezeigt und in Tabelle 1 näher erläutert.

15

Die DNA-Sequenzen der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die in den Beispielen angegebenen Größen der PCR-Fragmente beziehen sich auf PCR-Fragmente, deren Enden mit den in den Beispielen genannten Restriktionsenzymen geschnitten wurden. Zusätzliche Restriktionsschnittstellen in den Oligonukleotiden wurden genutzt, um die PCR-Fragmente vor den in den Beispielen geschilderten Klonierungen zuerst in *E.coli*-Standardplasmiden zu klonieren.

20

Die DNA-Sequenz des Gens der Actinomycin Synthetase II (*acmB*) ist in der Datenbank „GenBank“ unter dem Eintrag AF047717 abgelegt. Die DNA-Sequenz eines 3849 bp *Bam*HI-Fragments aus dem Gen der Actinomycin Synthetase III (*acmC*) ist den Beispielen nachfolgend beigelegt.

25

Beispiel 1

30

Einführen einer Restriktionsschnittstelle in das Gen der Actinomycin Synthetase II, um einen Austausch einer Aktivierungsdomäne zu ermöglichen.

Die Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* besitzt zwei Module ohne N-Methyltransferase-Domäne, von denen Modul 1 die Aminosäure Threonin und Modul 2 die Aminosäure Valin aktiviert. Um die Aktivierungsdomäne von Modul 2 austauschen zu können, wurde durch Mutagenese eine *EcoRV*-Schnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) eingeführt. Diese *EcoRV*-Schnittstelle und eine bereits im Gen vorhandene *Clal*-Schnittstelle ermöglichen es, den für die Aktivierungsdomäne von Modul 2 kodierenden Bereich durch beliebige *Clal*-*EcoRV*-Fragmente auszutauschen. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

35

40

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Zur Erzeugung einer *EcoRV*-Restriktionschnittstelle in das Gen der ACMS II (*acmB*) wurde das Plasmid pACM5 genutzt (Abbildung 4; Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol., 180:2468-2474). Das Plasmid pACM5 (Abbildung 4) trägt das *acmB*-Gen hinter einem konstitutiven Streptomyceten Promotor (*mel P*) und ist ein Derivat des Streptomyceten-Plasmids pIJ702. Durch PCR-Mutagenese und entsprechende Klonierungen wurde eine *EcoRV*-Schnittstelle in das *acmB*-Gen hinter den für die Phosphopantethein-Bindungsstelle kodierenden Bereich (in Modul 2) an Basenpaar (bp) Position (Pos.) 6251 eingeführt:

acmB wildtyp (bp 6244-6262) : 5'- ^{V R D V F E}gtccgggacgtcttcgag (bp Pos. 6251)

acmB mutagenisiert (bp 6244-6262) : 5'- ^{V R D I F E}gtccgggatattcttcgag ^{EcoRV}(bp Pos. 6251)

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Zuerst wurde ein 4923 bp *PstI*-*Clal*-Fragment, welches den *mel*-Promotor und den größten Teil des 5'-gelegenen Bereichs der *acmB* umfaßt (bis zur *Clal*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 in *acmB*) aus pACM5 isoliert und in das *E.coli* Plasmid pSP72 kloniert (A in Abbildung 5). Danach wurde ein Teil des direkt anschließenden 3'-Bereiches der *acmB* (beginnend mit der *Clal*-Schnittstelle an bp 4519) mit den Oligonukleotiden *prim-A* und *prim-B* durch PCR amplifiziert (PCR-Fragment 1 in Abbildung 5) und als 1737 bp *Clal*-*EcoRV*-Fragment eingefügt (B in Abbildung 5). Die durch *prim-B* eingeführte *EcoRV*-Schnittstelle entspricht bp Pos. 6251 in *acmB*. Die zusammengesetzten Fragmente wurden dann als komplettes *PstI*-*EcoRV*-Fragment isoliert und in pBlueScript umklontiert (C in Abbildung 5). Hieraus kann dann der zusammengesetzte 5'-Bereich der *acmB* zur späteren Klonierung als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment isoliert werden. Der noch fehlende 3'-Bereich der *acmB* wurde mit den Oligonukleotiden *prim-C* und *prim-D* amplifiziert (PCR-Fragment 2 in Abbildung 5) und als 2583 bp *EcoRV*-*BamHI*-Fragment in pSP72 kloniert (D in Abbildung 5). Das erhaltene Plasmid wurde mit *BglII* und *EcoRV* geschnitten und der 5'-Bereich der *acmB* (isoliert als *BamHI*-*EcoRV*-Fragment wie oben beschrieben) eingesetzt. Dies ergibt Plasmid pACM00-A (Abbildung 5), welches das vollständig zusammengesetzte *acmB* Gen mit der an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle trägt.

Beispiel 2

Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität in einer PPS.

Der Austausch einer vollständigen Aktivierungsdomäne wurde in der Actinomycin Synthetase II (ACMS II) aus *Streptomyces chrysomallus* vorgenommen. Die Aktivierungsdomäne von Modul 2 wurde durch eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität ausgetauscht. Die zum Austausch verwendete Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität stammt aus der Actinomycin Synthetase III (ACMS III) und ist ebenfalls spezifisch für Valin. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Der Bereich zwischen einer in *acmB* liegenden *ClaI*-Schnittstelle an bp Pos. 4519 und einer an bp Pos. 6251 eingeführten *EcoRV*-Schnittstelle (in Plasmid pACM00-A aus Beispiel 1), welcher für die zweite Aktivierungsdomäne der ACMS II kodiert, wurde deletiert und durch ein mit PCR generiertes 2961 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment ersetzt, welches für eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität der ACMS III mit Spezifität für Valin kodiert. Die Bereiche an den Fusionsstellen (*ClaI* und *EcoRV*) kodieren für in beiden PPS konservierte Regionen, welche N-terminal und C-terminal zu den Aktivierungsdomänen lokalisiert sind. Nach der Insertion des PCR-generierten *ClaI*-*EcoRV*-Fragments in das modifizierte *acmB* Gen entsteht wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

20	modifizierte ACMS II (in Plasmid pACM00-A)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>S R I D V L T</p> <p>.. agccg<u>tatcgat</u>gtcttcacc.....</p> <p><i>ClaI</i></p> <p>(bp Pos. 4591)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>S V R D I F E</p> <p>.. tccgtccgggagcgtcttcgag ..</p> <p><i>EcoRV</i></p> <p>(bp Pos. 6251)</p> </div> </div>
25		
30	Aktivierungsdomäne aus der ACMS III (2961 bp PCR-Fragment)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>V L T</p> <p><u>atcgat</u>gtccttcacc.....</p> <p><i>ClaI</i></p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>G L R</p> <p>.. ggcctgCGcgatcttcgag ..</p> <p><i>EcoRV</i></p> </div> </div>
35		
40	rekombinante ACMS II (in Plasmid pACM00-B)	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>S R I D V L T</p> <p>.. agccg<u>tatcgat</u>gtccttcacc.....</p> <p><i>ClaI</i></p> <p>(bp Pos. 4591)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>G L R D I F E</p> <p>.. ggcctgCGcgatcttcgag ..</p> <p><i>EcoRV</i></p> <p>(bp Pos. 7480)</p> </div> </div>

Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-B, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die enzymatische Aktivität der eingeführten Aktivierungsdomäne nach der Expression des PPS-Gens wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Von einem 3849 bp *BamHI*-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt), welches für eine Valin-Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Domäne kodiert, wurde mit den Oligonukleotiden *prim-E* und *prim-F* durch PCR ein 2967 bp *ClaI*-*EcoRV*-Fragment amplifiziert (PCR-Fragment 4 in Abbildung 6). Dieses *ClaI*-*EcoRV*-Fragment wurde in das

Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *ClaI-EcoRV*-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *BglII-HindIII*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-B (Abbildung 7), welches sowohl in *E.coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 3

Umwandlung einer Aktivierungsdomäne ohne N-Methyltransferase-Aktivität in eine Aktivierungsdomäne mit N-Methyltransferase-Aktivität und Einbringen dieser umgewandelten Aktivierungsdomäne in eine PPS.

In die Valin-Aktivierungsdomäne aus Modul 2 der ACMS II wurde zwischen die Adenylierungs-Domäne und die ACP-Domäne eine zusätzliche N-Methyltransferase-Domäne inseriert. Hierdurch wird die Aktivierungsdomäne der ACMS II mit einer zusätzlichen N-Methyltransferase-Aktivität versehen. Die eingesetzte N-Methyltransferase-Domäne stammt aus Modul 3 der ACMS III. Der Austausch beinhaltet zahlreiche Klonierungsschritte, welche zunächst formal und nachfolgend detailliert beschrieben werden.

1. Formale Zusammenfassung der Klonierungsstrategie:

Zur geplanten Insertion der N-Methyltransferase-Domäne wurden zuerst zwei *SnaBI*-Schnittstellen im Gen der *acmB* an bp Pos. 5899 und bp Pos. 5932 durch PCR-Mutagenese eingeführt. Anschließend wurde der zwischen den beiden *SnaBI*-Schnittstellen liegende Bereich von 33 bp deletiert und durch ein 1263 bp *EcoRV-EcoRV*-Fragment, welches für die oben genannte N-Methyltransferasedomäne der ACMS III kodiert, ersetzt. Die Ligation der *SnaBI*-Enden mit den *EcoRV*-Enden führt zur Bildung einer mit diesen beiden Restriktionsenzymen nicht mehr spaltbaren DNA-Sequenz an den Fusionsstellen. Nach der Insertion des PCR-generierten *EcoRV-EcoRV*-Fragments entsteht bei einer der beiden möglichen Orientierungen wieder ein durchgehender Leserahmen, welcher für eine rekombinante ACMS II kodiert:

ACMS II	R L V A Y V V A D G G T A P D G L R E A L
	.. cgccctcgctcgccctacgtcgctcgccggacggcggaacggccccggacggtctgctcgcgaggccctc ..
	(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)
modifizierte ACMS II	R L V A Y V R E A L
	.. cgccctcgctcgccctacgttagtcgccggacggcggaacggccccggactacgtacgcgaggccctc ..
	<i>SnaBI</i> <i>SnaBI</i>
	(bp Pos. 5899) (bp Pos. 5932)
N-Methylierungs-Domäne aus der ACMS III (1263 bp PCR-Fragment)	I V A D L L T D
	<i>gatATCGTCGCGGAC</i> <i>CTGCTCACCGATatc</i>
	<i>EcoRV</i> <i>EcoRV</i>

rekombinante ACMS II (in Plasmid pACM00-C)	R L V A Y I V A D cgccctcgctcgccctacATCGTCGCGGAC.....CTGCTCACCGATgtacgcgagggccctc ... (bp Pos. 5899)	L L T D V R E A L CTGCTCACCGATgtacgcgagggccctc ... (bp Pos. 7156)
--	--	---

Das Gen der rekombinanten ACMS II (in Plasmid pACM00-C, Abbildung 7) wurde in *Streptomyces lividans* transformiert und die neu eingeführte N-Methyltransferase-Aktivität der rekombinanten PPS wie in Beispiel 4 beschrieben nachgewiesen.

2. Detaillierte Beschreibung der einzelnen Klonierungsschritte:

Zur Einführung der *SnaBI*-Schnittstellen wurden der Bereich des *acmB*-Gens von bp Pos. 4591 bis 5899 mit den Oligonukleotiden *prim-G* und *prim-H* (PCR-Fragment 1 in Abbildung 6) sowie der Bereich von bp Pos. 5932 bis 6251 mit den Oligonukleotiden *prim-I* und *prim-J* (PCR-Fragment 2 in Abbildung 6) durch PCR amplifiziert. Danach wurde zuerst das PCR-Fragment 2 als 330 bp *HindIII-EcoRV*-Fragment in pBlueScript kloniert und dann das PCR-Fragment 1 als 1386 bp *ClaI-SnaBI*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht ein DNA-Fragment, welches für die fast vollständige Aktivierungsdomäne von Modul 2 der ACMS II kodiert und in welches eine *SnaBI*-Schnittstelle eingeführt wurde (A in Abbildung 6). In diese *SnaBI*-Schnittstelle wurde anschließend ein 1263 bp *EcoRV-EcoRV*-Fragment eingesetzt, welches von einem 3849 *BamHI*-Fragment aus dem Gen der ACMS III (*acmC*, die Sequenz ist beigefügt) durch PCR mit den Oligonukleotiden *prim-K* und *prim-L* amplifiziert wurde (PCR-Fragment 3 in Abbildung 6). Die Orientierung des inserierten *EcoRV-EcoRV*-Fragments, welches für die N-Methyltransferase-Domäne der ACMS III kodiert, wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Durch die Fusion der *EcoRV*-Enden mit den *SnaBI*-Enden konnte die zusammengesetzte Aktivierungsdomäne dann komplett als 2961 bp *ClaI-EcoRV*-Fragment isoliert werden und wurde in das Plasmid pACM00-A (aus Beispiel 1) kloniert und hierdurch das ursprünglich in pACM00-A vorhandene *ClaI-EcoRV*-Fragment ausgetauscht. Das erhaltene Plasmid wurde mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und der Streptomyceten-Anteil aus Plasmid pSPIJ004 (Abbildung 4) als 5130 bp *BglII-HindIII*-Fragment eingesetzt. Hierdurch entsteht das Plasmid pACM00-C (Abbildung 7), welches sowohl in *E.coli* als auch in Streptomyceten transformiert und selektioniert werden kann.

Beispiel 4

Expression rekombinanter PPS mit eingeführter N-Methyltransferase-Domäne und *in vitro* Testung ihrer N-Methyltransferase-Aktivität.

Zur Expression der in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS-Gene wurden die dort beschriebenen Plasmide pACM00-B und pACM00-C (Abbildung 7) in *Streptomyces lividans* (Stamm TK64) transformiert. Die Transformation sowie die mikrobielle Kultivierung von Streptomyceten erfolgte nach Standardprotokollen (Hopwood *et al.* (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England). Die Reinigung der plasmidkodierten PPS aus den Transformanten erfolgte jeweils aus 1 Liter YEME

Kulturmedium nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (3 Tage Wachstum). Die Reinigung der PPS auf einen für die Analyse notwendigen Reinheitsgrad beruht im wesentlichen auf einem bereits detailliert beschriebenen Protokoll (Schauwecker *et al.* (1998) J. Bacteriol. 180:2468-2474) und wird deshalb im Folgenden nur schematisch erläutert: Zur Freisetzung von Proteinen wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen (French-Press). Die ebenfalls freigesetzte genomische DNA wurde durch eine Inkubation mit DNase I gespalten um eine dünnflüssige Suspension zu erhalten. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und Proteine anschließend durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 55% gefällt. Die gefällten Proteine wurden durch eine Ausschußchromatographie (Säulenmatrix: Ultrogel-AcA-34 von Biosepra) nach Größe aufgetrennt. Proteinfractionen mit Proteinen einer Größe von mehr als 200 kDa wurden vereinigt und weiter über einen Anionenaustauscher (Säulenmatrix: Q-Sepharose FF von Pharmacia) aufgereinigt. Die an den Anionenaustauscher gebundenen Proteine wurden durch kontinuierliche Zugabe von NaCl vom Anionenaustauscher freigesetzt. Die in den Beispielen 2 und 3 konstruierten PPS eluierten in einem Bereich zwischen 150 bis 250 mM NaCl. Die nach diesem Protokoll partiell gereinigten PPS können dann beispielsweise nach folgenden Vorschriften weiter analysiert werden:

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der spezifischen Erkennung und Bindung von Aminosäuren an eine PPS:

100 µl angereinigte PPS werden mit 3 µl ¹⁴C-markierter Substrataminosäure (100 µCi/ml), 2 µl MgCl₂ (1 M) und 15 µl ATP (0,1 M) gemischt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die PPS wird durch Zugabe von 2 ml 7% Trichloressigsäure (TCA) gefällt, mit 10 ml 5% TCA gewaschen und die am Enzym gebundene Menge der Substrataminosäure durch Messen der Radioaktivität bestimmt.

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierte N-Methylierung von Aminosäuren :

Zum Nachweis der N-Methylierungs-Aktivität wird die PPS wie oben beschrieben mit ¹⁴C-markierter Substrataminosäure inkubiert, dem Ansatz aber noch zusätzlich 3 µl 0,1 M S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Donor für die auf die Aminosäure übertragene Methylgruppe zugesetzt. Nach der TCA-Fällung wird die PPS mit 4 ml 5% TCA (zwei Portionen) und danach mit 2 ml Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Durch Zugabe von 300 µl Perameisensäure und einer Inkubation für 6 Stunden bei 20 °C wird die als Thioester gebundene Substrataminosäure freigesetzt. Der Ansatz wird anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Die Aminosäure wird durch Zugabe von 40 µl Ameisensäure gelöst und die Umwandlung in die N-methylierte Form beispielsweise durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Für die Umwandlung von Valin in N-Methyl-Valin kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl von der PPS freigesetzten (¹⁴C-markierte) Aminosäure

wird parallel mit 5 µl der entsprechenden Referenzen (0,1 M Valin und 0,5 M N-Methyl-Valin) auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merck) mit dem Laufmittel n-Butanol:Essigsäure:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die Aminosäuren werden durch eine Ninhydrinreaktion, und einem Autoradiogramm für die ¹⁴C-markierte Substrataminosäure, sichtbar gemacht.

5

Beispielvorschrift zum *in vitro* Nachweis der durch eine PPS katalysierten Bildung von Peptiden:

Grundsätzlich kann ein Peptid durch saure Hydrolyse und anschließendem Nachweis der einzelnen Aminosäurekomponenten auf einfachem Wege analysiert werden. Dies trifft besonders auf Peptide zu, welche durch PPS gebildet werden, da die Aminosäuresequenz des synthetisierten Peptids durch die Anordnung der Module bereits bekannt ist. Durch den Einsatz von ¹⁴C-markierten Aminosäuren kann die Analyse des *in vitro* gebildeten Peptids beispielsweise wie folgt durchgeführt werden: 100 µl angereinigte PPS wird mit allen Substrataminosäuren der PPS (jeweils 2 mM), SAM (2 mM), ATP (10 mM) und MgCl₂ (20 mM) in einem Gesamtvolumen von 150 µl für 25 min bei 30°C inkubiert. Gegebenenfalls können der Inkubation auch weitere Enzyme, welche mit der zu testenden PPS zusammenarbeiten, zugesetzt werden (Pfennig *et al.* (1999) JBC 274: 12508-12515). Es werden mehrere Inkubationen parallel angesetzt, wobei sich die Zahl der Ansätze nach der Anzahl der Module in der PPS richtet und in jedem Ansatz die dem Modul entsprechende Aminosäure ¹⁴C-markiert eingesetzt wird. Aus jedem Ansatz wird die PPS wie oben beschrieben mit TCA gefällt, das Syntheseprodukt mit Performsäure abgespalten und das gebildete Peptid nach dem Einengen in Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) gelöst und durch chromatographische Methoden nachgewiesen. Zum Nachweis der Threonyl-N-methyl-Valin Peptidverknüpfung durch die in Beispiel 2 und 3 konstruierte PPS kann beispielsweise folgendermaßen verfahren werden: 20 µl des von der PPS freigesetzten Peptids aus jedem Ansatz (ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Threonin und ein Ansatz mit ¹⁴C-markiertem Valin) werden auf einer Kieselgel 60 DC-Folie (Merk) mit dem Laufmittel n-Butanol:Eisessig:H₂O (Volumen 80:20:20) chromatographiert. Die bei beiden Ansätzen entstehenden Produkte mit identischem R_f-Wert werden durch Extraktion mit Ethanol:Wasser (Volumen 1:1) isoliert, im Vakuum eingeeengt und die Aminosäuren durch saure Hydrolyse (6 N HCl, 110°C, 20h) aus den Peptiden freigesetzt. Die Identifikation der freigesetzten ¹⁴C-markierten Aminosäuren erfolgt durch erneute Chromatographie auf DC-60 Platten mit dem gleichen Laufmittel. Hierdurch können die Komponenten Threonin und N-Methyl-Valin im gebildeten Peptid nachgewiesen werden. Besteht ferner die Möglichkeit, ein Referenz-Peptid auf chemischen Weg zu synthetisieren, kann dieses direkt mit dem enzymatisch gebildeten und ¹⁴C-markierten Peptid verglichen werden, beispielsweise durch HPLC mit einer zur Trennung von Peptiden geeigneten Säule wie der SuperPac Pep-5 - Säule von Pharmacia.

Tabelle 1

Verwendete Ausgangsplasmide zur Durchführung der Beispiele

Plasmid	Quelle oder Literaturzitat	Selektion	Beschreibung
pSP72	Promega	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i> .
pBlueScript	Stratagene	Amp	Kommerzieller Klonierungsvektor für <i>E.coli</i>
plJ702	Katz <i>et al.</i> (1983) J. Gen. Microbiol. 129 : 2703-2714	Tsr	Weit verbreiteter Klonierungsvektor für Streptomycceten. Er trägt die Melanin (<i>mel</i>) Gene <i>melC1</i> und <i>melC2</i> unter Kontrolle ihres Promotors (<i>mel-P</i>).
pSPIJ004	Eigenentwicklung	Amp Tsr	Das Plasmid ist eine Kombination aus pSP72 und plJ702 und ist sowohl in <i>E.coli</i> als auch in Streptomycceten replizierbar. Hierzu wurde das <i>PstI-BglII</i> -Fragment aus plJ702 in den Polylinker von pSP72 kloniert.
pACM5	Schauwecker <i>et al.</i> (1998) J. Bacteriol. 180 : 2468-2474	Tsr	Das Plasmid ist ein plJ702-Derivat und trägt das Gen der Actinomycin Synthetase II (<i>acmB</i>) unter Kontrolle des <i>mel</i> -Promotors.

Abkürzungen: Tsr = Thiostrepton; Amp = Ampicillin;

Tabelle 2

Bei den Beispielen verwendete PCR-Oligonukleotide

Oligonukleotid	DNA-Sequenz und Restriktionsschnittstellen
prim - A	5'- gccggaattccgatatcgatgtcctcaccgccgaggaga EcoRI ClaI
prim - B	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat EcoRI EcoRV
prim - C	5'- tctccgtccgggatatcttcgagcagcgcacg EcoRV
prim - D	5'- atggcctgagttgctggatcctggcgatcccga BamHI
prim - E	5'- ctccagccgcacatcgatgtcctca ClaI
prim - F	5'- cgccctcgaagatatcgcgacaggccca EcoRV
prim - G	5'- gcaggaattcagccgtatcgatgtcctca EcoRI ClaI
prim - H	5'- ttccggaattcgcgactacgtaggcgacga EcoRI SnaBI
prim - I	5'- cggccaagctttacgtacgcgaggccctccggcggcgccct HindIII SnaBI
prim - J	5'- tgcggaattcgaagatatcccgacggagaaaccgat EcoRI EcoRV

17

Nukleotidsequenz des bei der Durchführung der Beispiele verwendeten *Bam*HI-Fragments aus dem *acmC* - Gen

Nukleotidsequenz:

Nummerierung:
der Basenpaare

5 GGATCCACCTGCTCGACACCGCCACCGCCCAACCCGAGCAGCCCTCAGCCGCATCGACG
TCCTCACCCCGGAGGAGAGGAACCGCACGATCGTCGAGGTCAACCGGACCGAACTGCCGC
10 TGCCCGACGCCTCGTTGGCGGAGCTGTTGAACAACAGGTGACCTCACACCGACGCC
CCGCCCTGTCAGCGACGGCGCCACGCTCAGTACTCCGAGCTCAACACGGCGGCCAAC
ACCTCGCCACACAGTCAACACCGGGGCATCCGCCCGGCGACGCGCTCGCCGTCTCC
15 TCCAACGCTCCCCGACACCGTCACACCGTCTCGCCCTCGCCAAGACCGCGCGACCT
ACATCCCCCTCGACAGCGCTACCCCGCGACCGCTACCGCTCGTCTCGACGAGACCC
GCACCAACTCCTCATCACCGACCAACACCGACCTCGACACCAACCAAGTTC
ACCCCGCGACACCCCGACGCGGAGACCCCGGCAACCCGAACACACACCCACC
20 CGACGACCGCGCTACATCATGTACACGAGCGCTCCACCGCGCGCCCAAGGGCGTCA
TCGCCACCCACCGCAACATCACCGCCCTCGCCCTCGACCCCGCTCGACCCACCGCC
ACGCGCGCTCTCTCCACTCCCCACCGCTTCGACGCTCCACCTACGAGATCTGGG
TCCCCCTCTCAACGGCAACACCGTCTCTCGCCCCACCGCGACCTCGACGTCCACA
CCTACACCGCGTCTACACCGACGAGATACCGCCCTCTGGCTGACGAGCTGGGTCT
25 TCAACTCTCGACGACGAGCGCGGAGACCTCACCGGGTCGCGCAGATCTGGACCG
GGCGCGAGGCGCTCTCGCGCGCCACCGTCACCGGCTTCAGCAGGATGCCCGACACCA
CCGTGGTCAGCGGTACGGCGCCACCGACACACCTTCGCCACCCACACCCCGTCC
CCACCCCTACACCGGCTCGCGCTCTCCCATCGCGCGCCCATGGCCACCATGCACA
CCTACGTGTCGACGACAGCTCCAGCCGTCGCCCCGGCGTCACCGCGAGCTTACC
30 TCCTGGCAGCGGCTCGCCCCGGCTACCTGGACCGCGCGCTCACCGCGAACGCT
TCGTGCCAACCCGTACGCGCGACCCGAGCATGTACCGCACCGGCGACCTGGCAC
GCTGGAACCCCGACGACACCTCGAGTACGCGCGCGCGCGACACAGGTCAAGTCC
GCGGCTTCGCGATCGAACCGCGGAGATCGAGAAGCTCTCACCGACCATCCGCGCTCG
CCAGGCGCGCTCCACCTCAACCGGGACCGCGCGCAACCCCGGCTCGTCGGTACG
35 TCCTCGCGACACCTCGCGCGCGAGCAGCATGTGGACAGCAGCAGATCGCGGAGT
GGCAGGACCTCTACGACTCCCTCTACGCGCGCGCCACCGCGAGTTCGGCGAGGACTTCT
CCGGCTGGAACAGCGCTACGACGCGCGCGGATCCCCCTCGACGAGATCGGGAGTGGC
GCGACGCGCGCTGGAACGCGATCCGCGCTCAACCCCGCGCGGTGCTGGAGATCGGCG
TCGGCACGGGCTGCTGCTCGGAAGCTGGCCCCGAGTGCAGGAGTACTGGGCGACGG
40 ACCTCTCGCCACCGTGTATCGAGGCGCTCTCCCGCACGTCGACCGCGACCGGAGCTGG
CCCGCGGTCACCTGCGGCGCGTCCGCGCACGAGCAGGAGGCTGCCGTCGCGC
ACTTCGACACCGTCTGTCTCACTCCGTGGTCCAGTACTTCCGAACCGCGACTACCTCG
CCAGGTCTACGAGCAGGCGCTGCGGCTGCTGGCCCCGGCGCGCGCTGTTTCATCGCG
45 ACATCCGCAACCCCGGCTGCTGCGACCTTCAACACCGCGCTCCAGACCGCCCGCGCG
AGGACCGCGCGACCGCGCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGAG
AGGAACCTCTGGTCGACCGGAGTACTTCAACCGGCTCACCCACCGCTCCCGGACCTCG
CCGCGCTCGACCTGCGGCTCAAGTGGCGCGCGCGCCACAACGAGTTGACCGCTACCGCT
ACGACACCGCTCCACAAGGCGGAACTCACCGCGCTCCCGCTGTCGAGGCGCGCGTCC
50 TGGCTGGCGCGAGGACCGCGAGGCACTCGCCCGCACCTGGCGAGGCGCGCGCGAGC
GGTGGCGCTCACCGCGCGCGCAACTCCCGGATAGCGCGGACCTCGCGCGCGAGCAG
CCCTGGAGTCCGGCACCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
CGGACCTCGAGGCACTCCACCGCTCGGGGAGGACACGGGTAAGTGGACGCGCTACCT
55 GGTCCGCCACCGCGCGGACACCGTCAACCTCACTTCGTCCGGCGCGCGCTGCTCGACG
GCGCGCTCCCGTCCGTACGTACGCCCCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCA
CCGCTTCAACCAACCCCGTGGCGAGCGCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGC
60 GCGAACACGCGCGCGCAACTGCCGACTACATGCGCGCGCGCGCAATCGTCCCGCTCG
ACCGCTGCCGCTCACCGCAACGGCAAGCTCGACCGGCGCGCGCTCCCGGCACTCGACC
CGGAGCACGCGGACACCG
TGTTGGCGAGGTGCTCGCGCGCGCGCTCGTGGTGTGACAGGACTTCTTCGACCTCG
65 GCGGCACTCGCTGCTCGCCACCGGCTGATCGCGCGCTGCGCGCGCGCTTTCGGCGTGG
AACTGGGCTGCGCAGCTCTTCGAGGCGCGGACGCGCGCGCGGATCGCGCGCGGCTGG
ACCTCGACGACCGGACGGCTCTACGAGGTGGTGTGCGGCTGCGCGCGCGAGGCGAGCA
GGCGCGCGTGTCTGTCATCCACCGGTCGGCGGATCAGTGGTGTGATACGCGCGCTGA
70 TCAAGCACCTCGGCCCGGAGTACCGCTGTACGGCATCAGGCGCGCAGCTGGCCGCGC
CGGAGCGCGCGCGGAGAGCATCGAGGAGATGGCGGTGACTACGCGACCATCCAGG
GCGTGCAGCGCACGCGCCCTACCACTGGCGGCTGGTGGTTCGGCGGCTGTGCGCGC
ATGCCCTGGCGCGGAGTTCAGCGCGCGCGCGAGCGGTCGCGCTGGTGGCGGTGCTCG
ATGTGATCCGAACTGGCAGGGCTCACCCAGACGACCTCCCGCGCGCGCGCGCGCGCG
TGATGCTGTGTACCACTCGGCTGTGACGACGCGAGCCACCGCAACGACCGCGAAG
AGCTGACCTTCGCCAGGCGCGCGGAGATCTGCGCGCGCGAGGCGAGTGTGCTCGCAAC
75 TGGAGGAGACCGGCTACCAAGATCACCGAGATCTCGGCAACCAACACCATCTGACCG
TCGACTACGACCGCGCGCGATCGACGCGGACCTGCTGCTGATCGCGCGCTCGGAACAGC
AGGACCGCGCGGTACCGCGGATGCTGGCGCGGTACGCTGCGCGCGCGGTGAGGCGCG
ACGTGGTGCCCGCGGAGCAGGCTCCATGCTGACCGCGCGCGGACCTGGCCGAGATCG
GCCGATCC

000000060
000000120
000000180
000000240
000000300
000000360
000000420
000000480
000000540
000000600
000000660
000000720
000000780
000000840
000000900
000000960
000001020
000001080
000001140
000001200
000001260
000001320
000001380
000001440
000001500
000001560
000001620
000001680
000001740
000001800
000001860
000001920
000001980
000002040
000002100
000002160
000002220
000002280
000002340
000002400
000002460
000002520
000002580
000002640
000002700
000002760
000002820
000002880
000002940
000003000
000003060
000003120
000003180
000003240
000003300
000003360
000003420
000003480
000003540
000003600
000003660
000003720
000003780
000003840
000003849

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zur Einführung von N-Methyltransferase-Domänen in PPS-Aktivierungsdomänen durch Veränderung von DNA-Sequenzen, welche für diese Domänen kodieren.
- 10 2. Verfahren zur Kombination von Genen oder Genabschnitten kodierend für PPS-Module ohne N-Methyltransferase-Domäne mit Genen oder Genabschnitten kodierend für Module mit N-Methyltransferase-Domäne.
- 15 3. Verfahren aus Anspruch 1 wobei die Veränderung durch Insertion einer DNA-Sequenz, welche für eine N-Methyltransferase-Domäne kodiert, in eine DNA-Sequenz, welche für eine PPS-Aktivierungsdomäne kodiert, erfolgt.
- 20 4. Verfahren aus Anspruch 1-3 wobei das für die N-Methyltransferase-Domäne kodierende DNA-Fragment zusammen mit DNA-Linker-Sequenzen inseriert wird.
- 25 5. Verfahren aus Anspruch 1-4 wobei bei der Insertion der DNA-Sequenz, welche für eine N-Methyltransferase-Domäne kodiert, gleichzeitig auch DNA-Sequenzen verändert werden, welche für die ACP-Domäne oder Aktivierungs-Domäne kodieren.
- 30 6. Verwendung der nach Anspruch 1-5 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher PPS-Gene, bereits veränderter PPS-Gene oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PPS-Genen oder Teilen davon.
- 35 7. Verwendung der nach Anspruch 1-6 hergestellten DNA-Sequenzen für die Veränderung natürlicher Gene von Polyketidsynthetasen (PKS), bereits veränderter PKS-Gene oder Teilen davon, sowie die Verwendung zur Neukonstruktion von PKS-Genen oder Teilen davon.
- 40 8. Verwendung der nach Anspruch 1-7 hergestellten DNA-Sequenzen für die Konstruktion von Plasmiden und genetisch veränderten Organismen zur Synthese der durch die DNA-Sequenzen kodierten Proteine.
- 45 9. Verwendung der nach Anspruch 8 hergestellten Proteine zur enzymatischen *in vivo* und *in vitro* Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden, Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten.
10. Verwendung der nach Anspruch 8 hergestellten Proteine zur fermentativen Synthese von Aminosäuren, Polypeptiden, Peptidyl-Acetyl-Mischstrukturen, welche N-methylierte Aminosäuren oder deren Derivate enthalten, wobei die Fermentation sowohl mit als auch ohne Zufütterung von Aminosäuren, Acetaten oder anderen organischen Zwischenprodukten erfolgen kann.

Hierzu folgen 7 Seiten Abbildungen

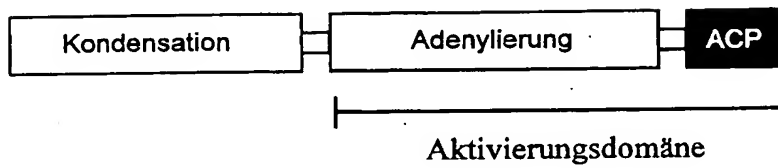
Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Veränderung von Peptidsynthetasen (PPS) in der Weise, daß sie ihre Substrataminosäuren N-methylieren können.

PPS sind Enzyme, die Peptide auf nicht-ribosomale Weise synthetisieren. Die von den PPS synthetisierten Peptide (oder die daraus hervorgehenden Derivate) sind oft von pharmazeutischem Interesse. Die PPS sind modular aufgebaut. Jedes Modul besitzt eine Aktivierungsdomäne, welche die jeweilige Substrataminosäure erkennt und kovalent bindet. Die von der PPS katalysierte Peptidsynthese erfolgt dann durch die Kondensation der kovalent gebundenen Substrataminosäuren. Eine geringe Anzahl der bekannten Aktivierungsdomänen ist in der Lage, die gebundenen Substrataminosäuren auch zu N-methylieren. Die hier beschriebene Erfindung ermöglicht die Umwandlung von Aktivierungsdomänen ohne N-Methyltransferase-Aktivität in Aktivierungsdomänen mit N-Methyltransferase-Aktivität, wobei die ursprüngliche Substratspezifität erhalten bleibt. Für jede Spezifität eines vorhandenen PPS-Moduls kann somit ein entsprechendes Modul-Derivat mit zusätzlicher N-Methyltransferase-Aktivität bereitgestellt werden. Diese Derivate können dann dazu genutzt werden, neue oder modifizierte PPS zu konstruieren, wodurch das synthetisierte Peptid dann an den gewünschten Peptidbindungen N-methyliert ist. Dies ermöglicht die Synthese neuer Peptide mit möglichen neuen pharmakologischen Eigenschaften.

Abbildung 1: Modul einer PPS und Unterteilung in funktionelle Domänen

A: Minimal-Modul einer PPS



B: Modul mit N-Methyltransferase-Domäne

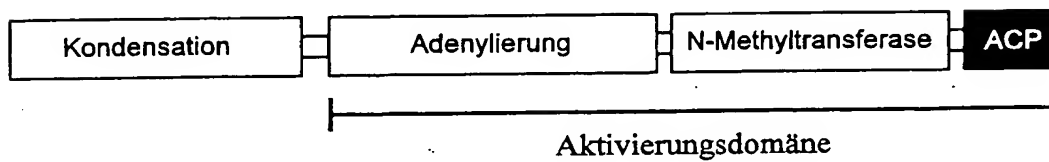
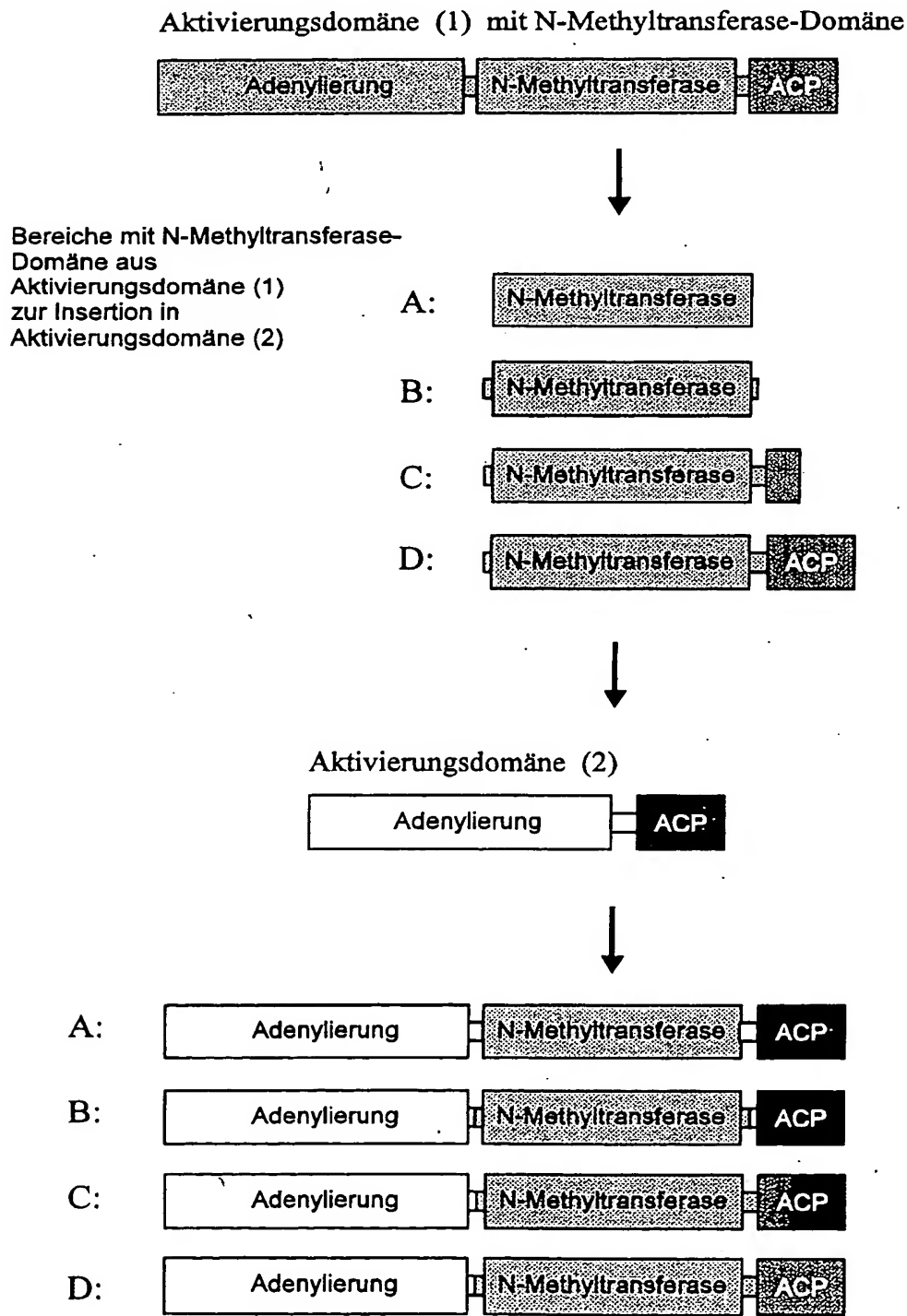
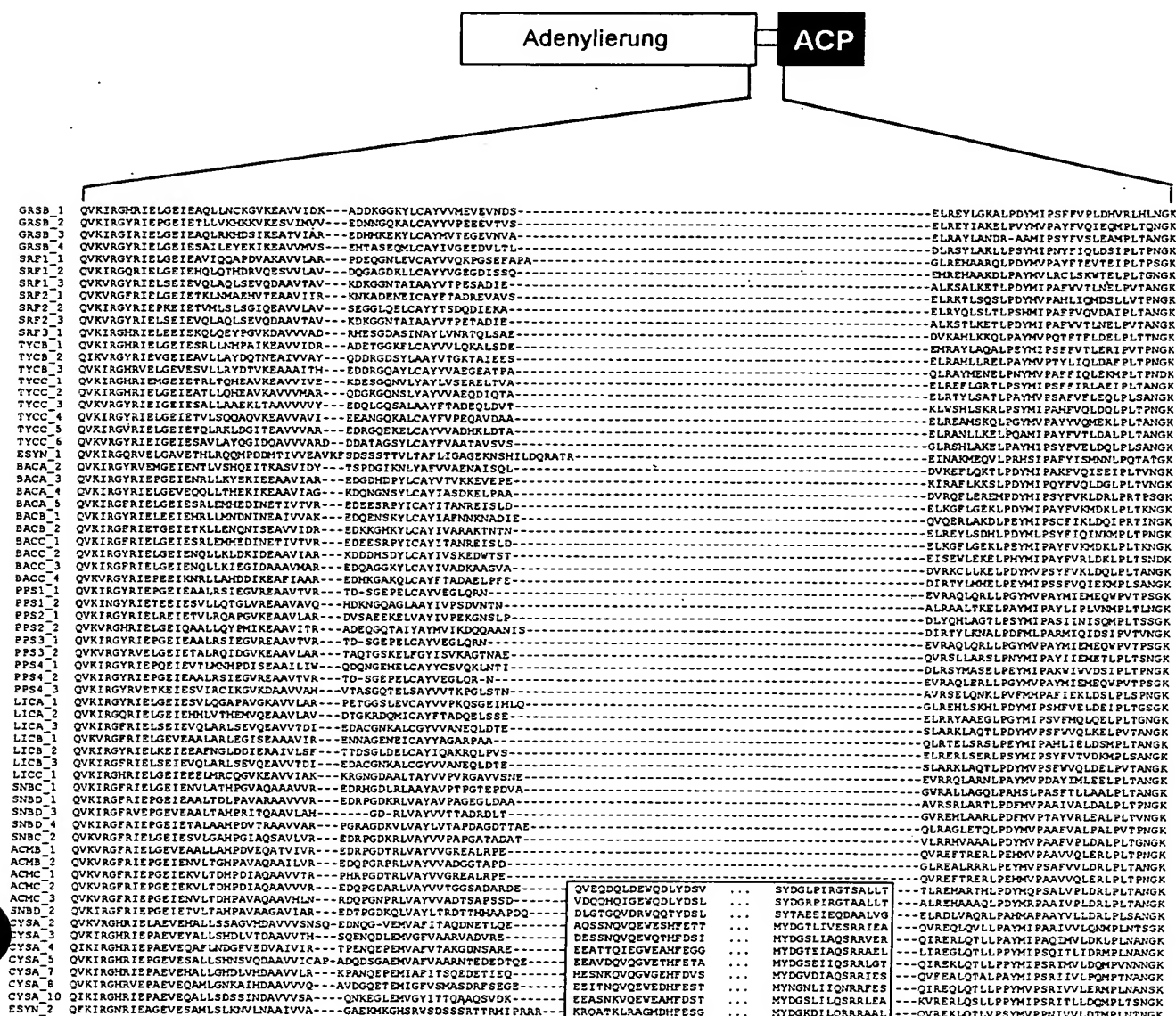


Abbildung 2: Umwandlung von Aktivierungsdomänen durch Insertion einer N-Methyltransferase-Domäne



Rekombinante Aktivierungsdomänen mit Spezifität von Aktivierungsdomäne (2) und N-Methyltransferase-Aktivität

Abbildung 3: Sequenzvergleich von ausgewählten Aktivierungsdomänen im Bereich der Übergänge zu N-Methyltransferase-Domänen.



core motif 5

N-Methyltransferase-Domänen

(Sequenzausschnitt an den
N-terminalen und C-terminalen
Enden der Domänen)

Konsensus am Übergang:

QIRExVxxxLPxYMP
EV L I
D

CYS A	Cyclosporine Synthetase aus <i>Tolypocladium niveum</i> (Z28383)
GRS A,B	Gramicidin S Synthetase I,II aus <i>Bacillus brevis</i> (P14687 / P14688)
ACM B,C	Actinomycin Synthetase II,III aus <i>Streptomyces chrysomallus</i> (AF047717 und beiliegende Sequenz)
BAC A,B,C	Bacitracin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (AF007865)
TYC A,B,C	Tyrociclin Synthetase I,II,III aus <i>Bacillus brevis</i> (AF004835)
LIC A,B,C	Lichenysin Synthetase A,B,C aus <i>Bacillus licheniformis</i> (U95370)
ESYN	Enniatin Synthetase aus <i>Fusarium scirpi</i> (Z18755)
SNB C,D	Pristinamycin I Synthetase C,D aus <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> (Q54959, X98690)
SRF 1,2,3	Surfactin Synthetase 1,2,3 aus <i>Bacillus subtilis</i> (P27206, Q04747, Q08787)
PPS 1,2,3,4	Fengycin Synthetase 1,2,3,4 aus <i>Bacillus subtilis</i> (Z34883)

Der dem Namen folgende Index bezeichnet die Nummer der Aktivierungsdomäne innerhalb der jeweiligen PPS (gezählt vom N-Terminus). Die Datenbanknummern der Sequenzen in „GenBank“ oder „SwissProt“ sind in Klammern angegeben.

Abbildung 4: Ausgangsplasmide zur Konstruktion der Beispiele

2.

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

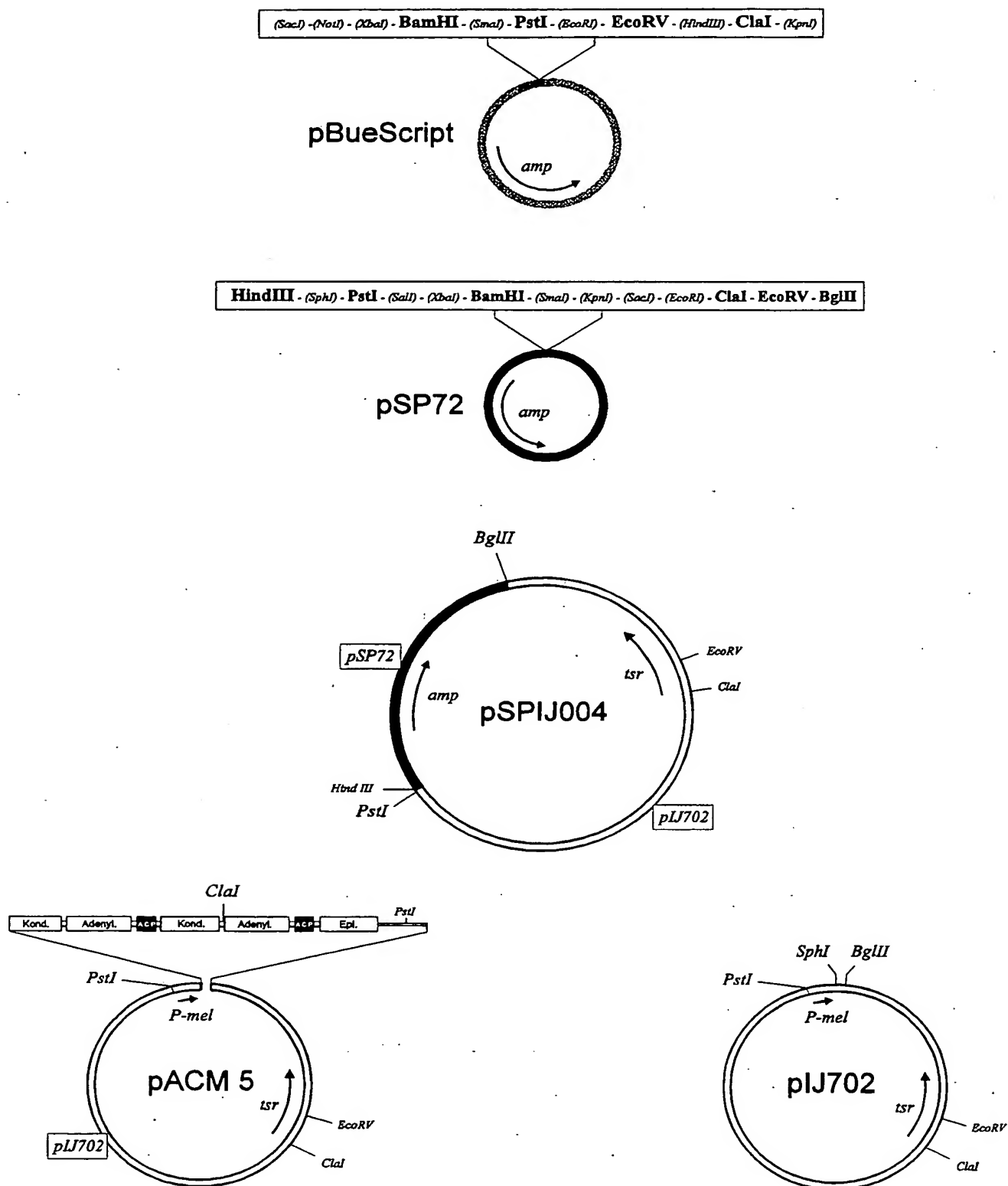


Abbildung 5 : Einführen einer *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle in *acmB*

2

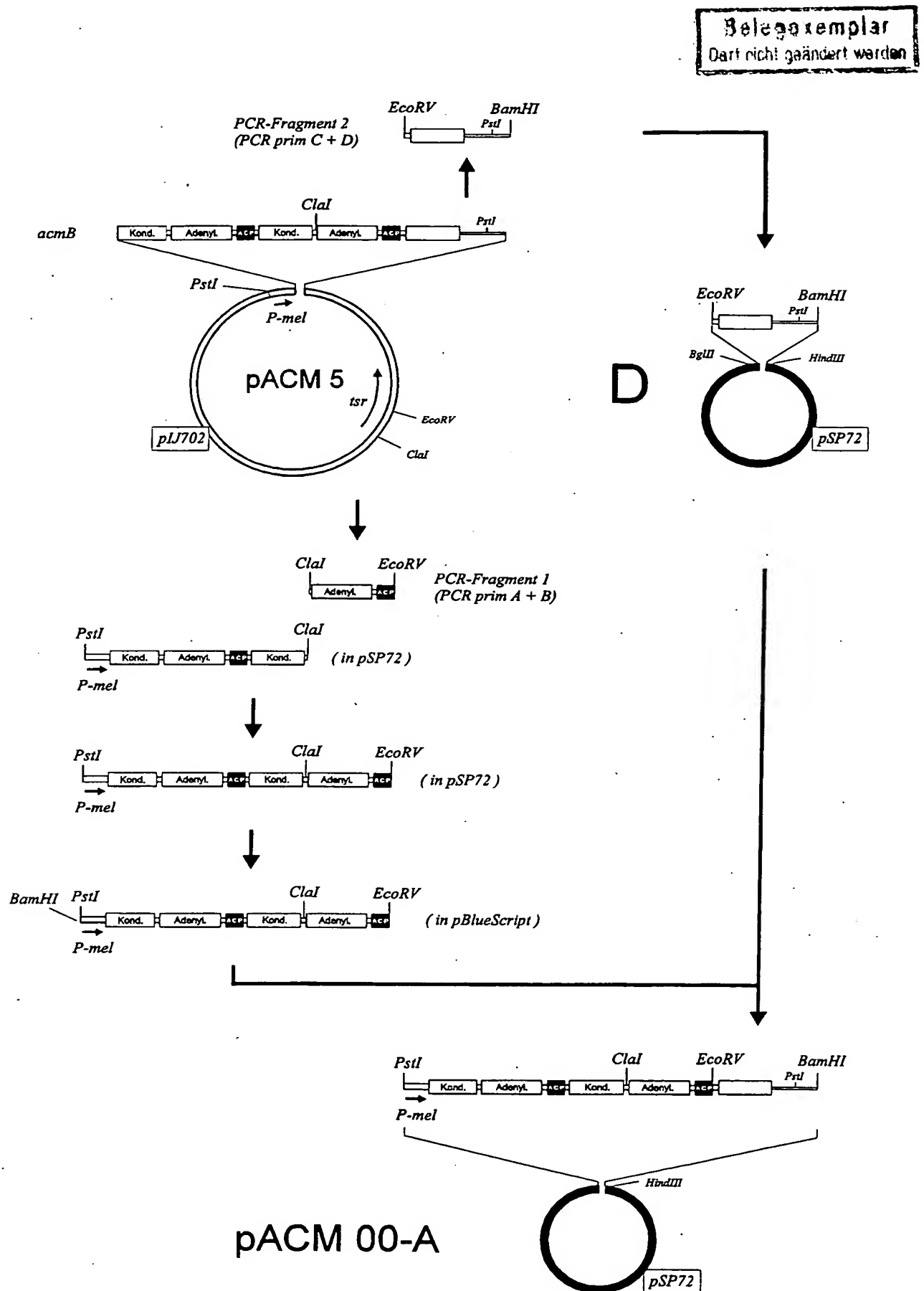


Abbildung 6 : Klonierung von *ClaI*-*EcoRV*-Kassetten für die Konstruktion rekombinanter *acmB*-Gene

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

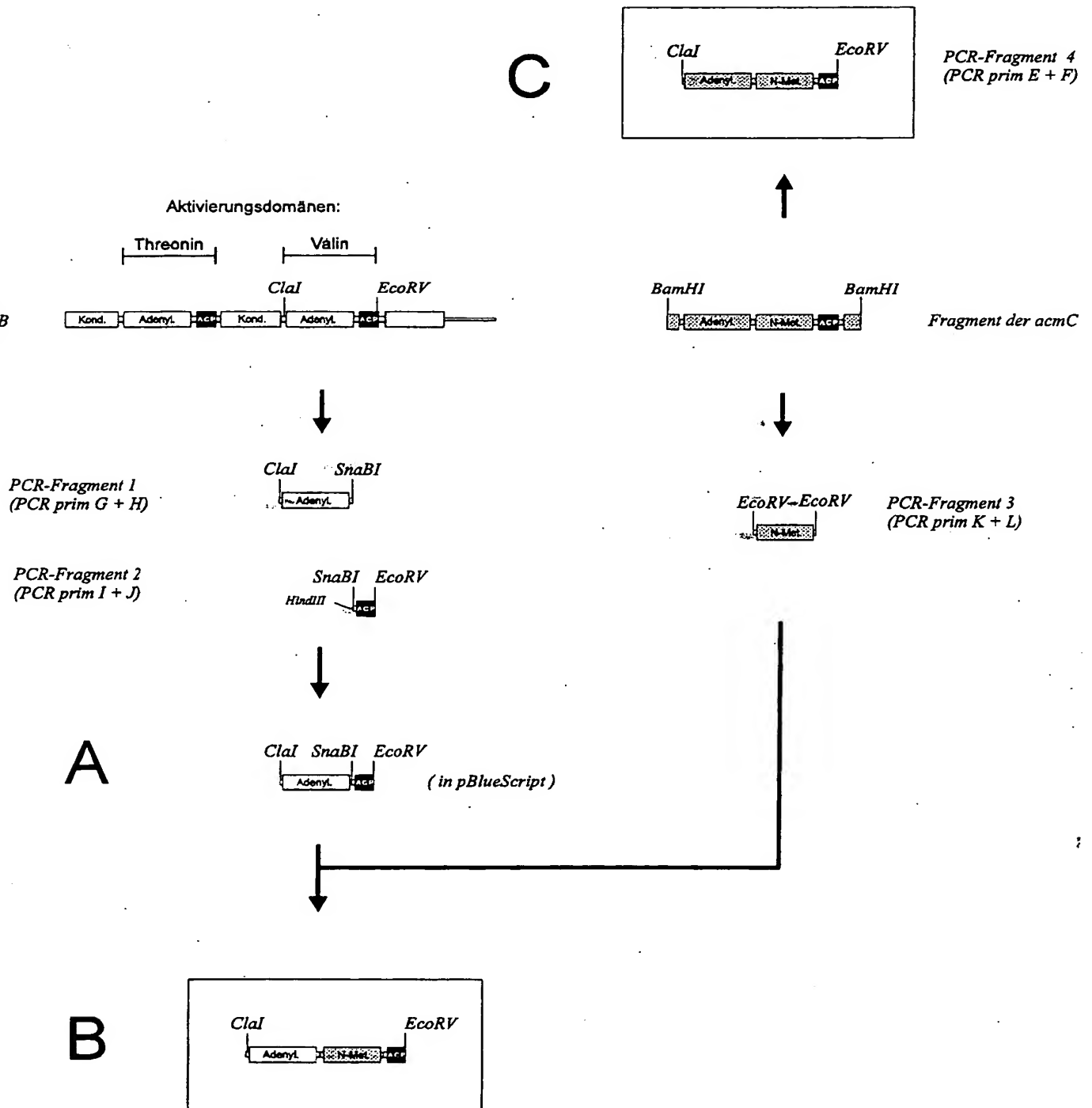
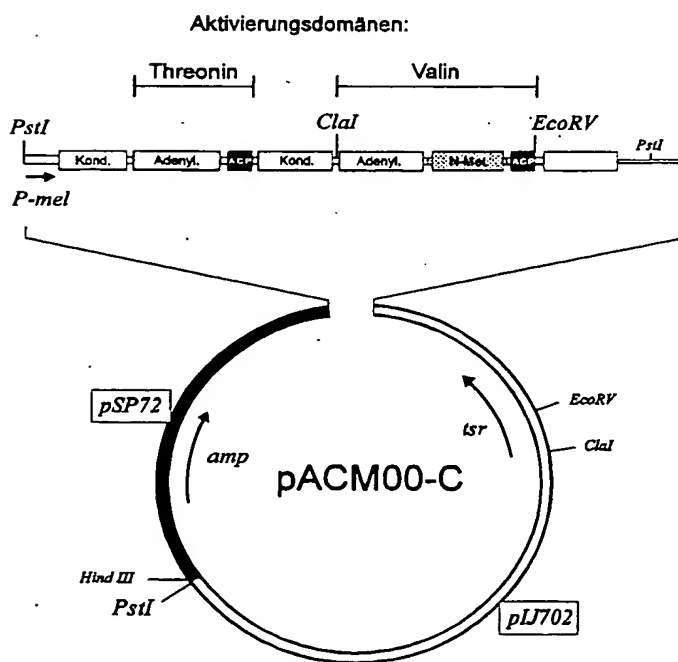
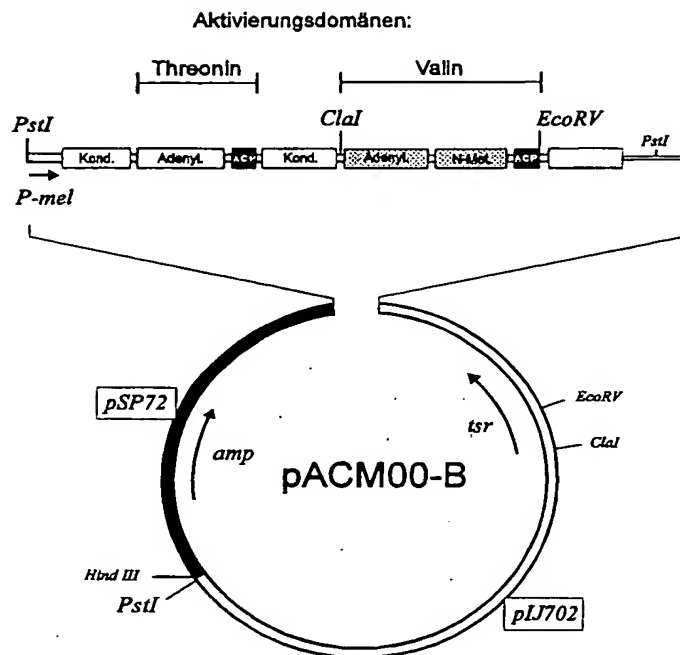


Abbildung 7 : Plasmide zur Expression der rekombinanten PPS-Gene



THIS PAGE BLANK (USPTO)